

**Orale und nasale Immunisierung gegen Tetanus
beim Menschen**

Ernst Baljer

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552316_0037

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Anton Mayr
und

der IV. Medizinischen Abteilung, des Städt. Krankenhauses
München-Schwabing

Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians-Universität München
für die Fächer Innere Medizin und Chirurgie

Leitung: Chefarzt Dr. Holzer

Orale und nasale Immunisierung gegen Tetanus beim Menschen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an
der Ludwig-Maximilians-Universität M ü n c h e n

vorgelegt von

Ernst Baljer

aus

Teisendorf

München 1978

Dekan: Prof. Dr. Spann

Berichterstatter: Prof. Dr. Mehnert

Tag der Promotion: 11. April 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität München



DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. Orale Impfung gegen Tetanus	2
2.2. Nasale Impfung gegen Tetanus	5
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
3.1. <u>Material und Methoden</u>	15
3.1.1. Versuchspersonen	15
3.1.2. Impfstoff	15
3.1.3. Immunisierung	15
3.1.4. Applikationsmodus und Impfdosis	16
3.1.5. Blutentnahme	16
3.1.6. Gewinnung der Sera	16
3.1.7. Indirekte Hämagglutination	16
3.1.7.1. Immunserum	17
3.1.7.2. Behandlung der Seren	17
3.1.7.3. Antigen	17
3.1.7.4. Sensibilisierung der Erythrozyten	17
3.1.7.5. Durchführung des Testes	18
3.1.8. Antitoxinbestimmung nach der L ₊ -Methode	18

	Seite
3.2. <u>Ergebnisse</u>	20
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	35
5. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	39/40
6. LITERATURVERZEICHNIS	41

Lebenslauf

1. Einleitung

Die Tetanus-Schutzimpfung ist heute weniger ein wissenschaftliches als mehr ein sozialmedizinisches Problem. Obwohl es sehr gute Impfstoffe gibt und die Notwendigkeit der Impfung außer Zweifel steht, läßt der Populationsschutz weltweit zu wünschen übrig. Im Jahr 1974 hatten selbst in der Bundesrepublik Deutschland nur gut die Hälfte der untersuchten Personen befriedigende Antitoxintiter im Serum (Habermann und Wellhöhner). Unbefriedigend waren die Ergebnisse vor allem bei alten Menschen. Nur bei 15,3 Prozent der Personen im Alter von 60 bis 98 Jahren konnte eine tragfähige Immunität gegen Tetanus nachgewiesen werden (Finger et al.).

Einen Ausweg aus dieser Situation erreicht man vielleicht durch den Ersatz der unpopulären Injektionsimpfung mittels einer lokalen Impfung. Die schmerzlose lokale Applikation läßt, wie das Beispiel Poliomyelitis zeigt, berechtigterweise auf einen höheren Durchimmunisierungsgrad in der Bevölkerung hoffen.

Von den vielen lokalen Immunisierungsarten stehen heute praktisch nur noch 2 Methoden zur Diskussion, nämlich die orale und nasale Impfung. In der vorliegenden Arbeit soll die Möglichkeit einer oralen und nasalen vergleichend mit der intramuskulären Tetanus-Schutzimpfung beim Menschen untersucht werden.

2. Schrifttum

2.1. Orale Impfung gegen Tetanus

Die orale Impfung konnte sowohl mit Toxoid als auch mit Toxin durchgeführt werden, da das Tetanus-Toxin nur in sehr hohen Dosen bei oraler Aufnahme eine Krankheit auslöst. Meist gingen die Untersuchungen mit Toxoid bzw. Toxin Hand in Hand und ergänzten sich speziell was die Frage der Persorption anbetrifft. Auch bei der Beurteilung der Ergebnisse wurde in den meisten Arbeiten kein Unterschied zwischen Toxin und Toxoid gemacht, da man davon ausging, daß sich beide Substanzen im Magen-Darm-Kanal gleich verhalten.

Die meisten Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß eine Resorption des Toxins vom intakten Magen-Darm-Kanal her nicht stattfindet und die orale Toxinapplikation bei Versuchstieren weder Krankheitssymptome noch die Ausbildung einer Immunität zur Folge hat (9,10,11,36,37,46,47,49,50). Als Ursache für die fehlende Resorption des Toxins sah man die zerstörende Wirkung von Ptyalin (9), Magensaft (10,30,49), Galle (30,46), Pankreassaft (10,30,50) und Darmsaft (50) an. Zudem wurde eine Abschwächung des Toxins durch die Bindung an Nahrungsteile diskutiert (37). Auch eine Magen-Darm-Passage ohne Veränderung und ohne Resorption des Toxins wurde beschrieben (36,41).

Daneben gab es aber auch Ergebnisse, die für die orale Immunisierung sprachen. Ramon und Grasset (31) erzielten z.B. durch mehrfach

hohe Gaben von Tetanus-Toxin eine schwache Immunität bei Meerschweinchen, ohne daß die Tiere dabei an Tetanus erkrankten. Auch Dumas (12) beobachtete eine Resorption des Toxins nach oraler Verabreichung an Versuchstiere. Während bei sehr jungen Versuchstieren schon nach alleiniger Toxin-gabe Tetanussymptome auftraten, konnte bei erwachsenen Tieren nur nach Gallevorbehandlung eine Resorption beobachtet werden.

Ramon und Grasset (31,32) versuchten dann als erste eine orale Impfung mit einem Formol-Anatoxin. Der Versuch gelang bei sehr jungen Tieren sofort, bei erwachsenen Kaninchen jedoch nur nach Galleprämedikation und massiver Antigendosierung. Durch wiederholte orale Toxoidzufuhr, sowohl in Form einer Boosterimpfung als auch als Primärimpfung, wurde bei Meerschweinchen die Bildung von Serumantitoxinen stimuliert. Der Impfschutz war um das 5- bis 50-fache schwächer als nach einer subkutanen Verabreichung der gleichen Dosis Anatoxin. Diese an Meerschweinchen gewonnenen Ergebnisse konnte Lemetayer (26) aber am gleichen Modell nicht nachvollziehen.

Auch beim Menschen waren die Ergebnisse nicht einheitlich. Durch die orale Anatoxinapplikation konnten Ramon und Zoeller (33) weder grundimmunisieren noch boostern. Nathan-Larrier et al., Greenberg und Fleming und auch Veronesi et al. beschrieben dagegen positive Ergebnisse (29,23,45).

Greenberg und Fleming griffen 1968 die orale Impfung des Menschen gegen Tetanus wieder auf. Nachdem sie in Vorversuchen

beim Meerschweinchen nach oraler Erst- oder Boosterimpfung mit einem Kombinationsimpfstoff aus Diphtherie- und Tetanus-Toxoid sehr gute Ergebnisse erzielt hatten (genaue Angaben fehlen), versuchten sie die orale Impfung beim Menschen. Versuchspersonen wurden je 2 Tabletten mit 320 Lf¹⁾ Tetanus-Toxoid an 4 aufeinanderfolgenden Tagen eine halbe Stunde vor dem Frühstück oral verabreicht. 5 Personen erhielten magenlösliche Tabletten, 5 andere dagegen Tabletten, die durch eine Kapsel vor dem Abbau im Magen geschützt waren. Zwei Wochen nach der Impfung erfolgte die Antitoxinbestimmung. Zwei von fünf Versuchspersonen, die mit den "geschützten" Tabletten immunisiert worden waren, zeigten schwache Anstiege der Antitoxintiter, dagegen niemand aus der Gruppe, die mit der normalen Tablette immunisiert worden waren. Die Autoren schlossen daraus, daß 1. das Tetanus-Toxoid bei der Magen-Passage vollständig zerstört wird und 2., daß nureine Resorption des Toxoids vom Dünndarm aus möglich ist. Endgültig bewerten läßt sich aber die Schluckimpfung auf Grund der geringen Probandenzahl nicht.

Veronesi et al. führten ebenfalls vor ihren Versuchen beim Menschen orientierende Versuche am Meerschweinchen durch. Die Tiere erhielten an 4 Tagen je 162 Lf flüssiges Toxoid

¹⁾ Lf = Limes flocculationis = Flockungseinheit. Sie entspricht der Toxinmenge, die von 1 I.E. Tetanus Antitoxin neutralisiert wird.

bei der Primärimpfung und einmal 162 Lf bei der Boosterimpfung. Genaue Angaben über die Applikationsform und den Applikationsmodus fehlen. Das Ergebnis war besser als bei Greenberg und Fleming. Die Antitoxintiteranstiege lagen um das 4-fache über dem Ausgangstiter. In daran anschließenden Versuchen beim Menschen erhielten Versuchspersonen morgens 2 Tabletten mit 354 Lf, die kurze Zeit auf der Zunge gelassen und dann hinuntergespült wurden. Zwei Wochen nach der Schluckimpfung war ein Antitoxintiteranstieg um das 2- bis 15-fache zu verzeichnen. Bei der Primärimpfung waren die Ergebnisse nicht so überzeugend. Erst nach 4 Impfungen mit jeweils 4 Tabletten (708 Lf) im Abstand von 4 bis 6 Wochen konnten sie relativ schwache Antitoxintiteranstiege messen.

In Modellversuchen an der Maus zeigten Baljer et al. (4,5), daß eine orale Impfung mit Tetanus-Toxoid nur dann zu einem belastbaren Schutz führt, wenn das Toxoid entweder intensiv mit den Schleimhäuten der Mundhöhle in Kontakt kam oder direkt, unter Umgehung des Magens, in den Dünndarm appliziert wurde. Im Magen wurde das Tetanus-Toxoid praktisch sofort zerstört, im Dünndarm verlor es innerhalb von 30 Minuten 60 % seiner Aktivität (vgl. auch S. 14).

2.2. Nasale Immunisierung gegen Tetanus

Die nasale Impfung mit Tetanus-Toxoid wurde sehr viel häufiger untersucht als die orale. Die meisten Versuche befaßten

sich mit der Aerosolimpfung und nur in einigen wenigen Versuchen wurden auch andere nasale Applikationsformen geprüft.

Bei der Maus stellten mehrere Untersucher übereinstimmend fest, daß durch die alleinige Inhalation von Tetanus-Toxoid bei Mäusen keine belastbare Immunität zu erzielen ist (Silberschmidt, Bartlema et al., Leclerg). Erst der Zusatz verschiedener bakterieller Adjuvantien führte zu einem regelmäßigen und wirksamen Schutz.

So verliefen anfängliche Immunisierungsversuche (Bartlema, 1966; Bartlema et al., 1969) selbst bei Gebrauch einer hoch gereinigten und konzentrierten Toxoid-Lösung (7.000 bis 10.000 Lf/ml) negativ. Weder eine relativ große Inhalationsmenge (40 bis 48 Lf) bei der Primäranwendung noch die zusätzliche aerogene Boosterung (10 bis 12 Lf) nach 3 Wochen verhinderte den tödlichen Ausgang der subkutanen Belastungsinfektion mit 50 LD₅₀ des Toxins (bezogen auf Mäuse). Nach vorangegangener subkutaner Erstimmunisierung hatte eine Boosterung per Aerosol allerdings einen gleich guten Immunisierungseffekt wie eine zweite subkutane Behandlung.

Die Verwendung eines bakteriellen Adjuvans verbesserte die Situation vor allem in bezug auf die Primärantwort. Abgetötete Bordetella pertussis-Zellen, in einer Menge von $3,8 \times 10^{10}$ Bakterien pro ml Toxoid (7000 Lf) wirkten nach einmaliger 40-minütiger Aerosolapplikation oder als aerogene Boosterung

genauso gut wie eine vergleichbare ein- bzw. zweimalige subkutane Impfung mit demselben Impfstoff. Der Anteil geschützter Tiere stieg auf 93,75 % nach der ersten und 100 % nach der zweiten Vernebelung. Man erreichte mit Adjuvans bei halber Dosis (8 bis 10 Lf) einen 100 % besseren Effekt als mit der doppelten Dosis (16 bis 20 Lf) ohne Adjuvans.

Außer auf die Primärantwort hatte die Anwendung von Adjuvans auch Auswirkungen auf die Boosterimpfung. So war für die Auslösung des Booster-Effektes, bei einmal mit Toxoid und Bordetellen behandelten Mäusen, eine zweite Gabe von reinem Toxoid allein genauso wirksam und führte ebenfalls zu einem 100 %igem Schutz. Die Serumantitoxintiter, gemessen im Mäuseschutztest und in der indirekten Hämagglutination, lagen nach zweimaliger Inhalation (2,56 AU Einheiten/ml) sogar höher als nach zweimaliger Injektion (0,45 AU/ml).

Neben ganzen, abgetöteten Bordetella pertussis-Keimen wurden auch andere Substanzen auf ihre Eignung als Adjuvans geprüft. Dabei wirkten lösliche Extrakte der Bordetellen ebenso gut wie die Bakterienzelle selbst. Freie Zellwände wiesen dagegen eine geringere Aktivität auf (Bartlema et al., 1969).

Aluminiumphosphat, das subkutan verabreicht bekanntlich gut wirkt, zeigte selbst nach 90 Minuten Verneblungsdauer keinen Effekt. Formalinabgetötete Klebsiella pneumoniae-Zellen waren bei einer Konzentration von 5 bis 6×10^9 Keimen/ml nur nach einer mehr als zweistündigen Inhalation wirksam (Bartlema et al., 1972).

Ganze formol-inaktivierte Bakterienzellen von *Salmonella* (S.) *typhi* und *S. minnesota*, in einer Menge von 10 ml auf 200 ml Anatoxin dreimal im 20 Tage-Rhythmus je 30 Minuten vernebelt, schützten Mäuse nicht vor einer Toxinbelastung mit 50 LD₅₀. Verschiedene Endotoxinextrakte aus derselben Bakterienspezies bewirkten dagegen eine bis zu 100 %ige Steigerung des Schutzeffektes, ohne daß im Neutralisationstest Antikörper nachweisbar gewesen wären. Die dreimalige Toxoidimpfung mit jeweils fünf unterschiedlichen Lipopolysaccharid-Präparationen (LPS) als Adjuvans im 15-Tage-Rhythmus ergab bis auf zwei Ausnahmen auch per Aerosol einen vollen Schutz, wobei die Steigerung der Adjuvansmenge auch den Immunisierungseffekt erhöhte. Antitoxintiter von 0,1 bis 2,0 Int.Einh./ml lagen im Vergleich zu der subkutanen Impfung zwar niedrig, aber "oberhalb der klassischen Grenze, von der ab ein Tier immunisiert ist" (Leclercq).

Beim Meerschweinchen, das im Gegensatz zu den Mäusen zu den für das Tetanus-Toxin hochempfindlichen Tieren zählt, gelang dagegen die Tetanusimpfung via Aerosol auch ohne Zusatz von Adjuvantien zum Tetanus-Toxoid.

Silberschmidt konnte Meerschweinchen vor einer 20-fach tödlichen Toxinmenge bereits 11 Tage nach sechs bis zwölf Expositionen, in denen insgesamt 60 bis 90 ml Anatoxin vernebelt wurden, schützen. Auch eine mehrfach tödliche Dosis Kulturmateriale überlebten die Tiere nach Applikation von 90 ml Anatoxin

verteilt auf 12 Sitzungen.

Die Möglichkeit der raschen und schmerzlosen Primärimmunisierung und Boosterung per Aerosol beim Meerschweinchen wurde von Yamashiroya et al. bestätigt. Sie benutzten ein flüssiges Toxoid mit 2.405 Lf je ml, von dem 0,4 ml je Minute vernebelt wurden. In der 300 l fassenden Plastikbox befanden sich jeweils acht erwachsene Meerschweinchen. Die respiratorische Dosis wurde abhängig von der Expositionsdauer kalkuliert und lag nach 20 bis 80 Minuten etwa zwischen 4 und 32 Lf. Im Vergleich zu den subkutan immunisierten Meerschweinchen, von denen alle eine Belastung mit 10 LD₅₀

Toxin überlebten und hohe Agglutinationstiter aufwiesen, war die Primärantwort der aerogen behandelten Tiere in jeder Beziehung als schwach zu bezeichnen. Sowohl die Antikörpertiter als auch die Überlebensraten lagen deutlich niedriger. Erst durch eine Steigerung der Inhalationsdosis von 9 auf 15 Lf konnten einigen Tieren auch durch die einmalige Aerosolbehandlung geschützt werden. Die aerogene Boosterung nach subkutaner Erstimmunisierung ergab bei etwa gleichgroßer Gesamtdosis die eindeutig höchsten Titer. Die Verwendung eines Aluminiumpräzipitierten Toxoids führte sogar zu nachweisbaren Titern von 1:317.490 (Yamashiroya et al., 1966 a).

Sehr oft wurde bei kleinen Versuchstieren (Maus, Kaninchen, Meerschweinchen) das Tetanus-Toxoid zur Aerosolimpfung mit anderen Antigenen kombiniert. Beschrieben sind Kombinationen

mit Staphylokokken-Toxoid (Titarenko), Salmonella-Antigen (13,14,15,41), Diphtherie-Toxoid (18,19), Botulinum-Toxoid (3), Endotoxin (27) und Bordetella-Antigen (21). Die Wirksamkeit der Tetanusimpfung wurde dadurch in keinem Fall beeinträchtigt, vielmehr ergaben sich sogar Anhaltspunkte einer Immunitätssteigerung.

Schützler und Dockhorn untersuchten bei Pferd und Schaf die Aerosolimpfung gegen Tetanus. Die Gruppenbehandlung bei Schafen erfolgt in einem 36 m³ großen Raum und wurde mit einem Gemisch aus Toxoid und Toxin durchgeführt. Bei anfänglich serologisch negativen Tieren ließ sich mit relativ hohen Dosen eine deutliche Antikörperreaktion auslösen, die dafür sprach, daß eine aerogene Tetanus-Immunisierung im Prinzip bei Schafen möglich ist. Insgesamt wurden dazu etwa 12.000 BE, verteilt in 1 x 20 ml und 4 x 100 ml, jeweils innerhalb von 60 bis 90 Minuten vernebelt. .

Der Versuch einer aerogenen Hyperimmunisierung bei bereits vorhandenen Ausgangstitern von 300 IE/ml und mehr schlug fehl. Selbst bei Antigenmengen bis 9.700 BE und Gesamteinwirkungszeiten bis zu 18 Stunden stiegen die Antitoxintiter nicht weiter an. Die inhalierbare Dosis reichte offenbar nicht aus um die Antitoxinbildung weiter zu stimulieren. Mit einem Viertel der Aerosoldosis bewirkte dagegen eine subkutane Hyperimmunisierung einen vierzehnmal höheren Titeranstieg. Diese an Schafen gewonnenen Ergebnisse ließen sich

auch auf das Pferd übertragen. Bei mengen- und zeitaufwendigerer Anwendung der Inhalationsmethode waren auch bei Pferden durchaus befriedigende Titer zu erreichen, so daß eine Immunisierung per Aerosol im Prinzip möglich zu sein scheint. Für die Gewinnung von Hyperimmunseren erwies sich die Methode jedoch auch bei dieser Tierart als unbrauchbar. Weder im geschlossenen System mit Atemmasken noch im offenen System mit Gruppen von zwei bis drei Pferden in einer 36 m³ großen Box konnten der subkutanen Impfung vergleichbare Titeranstiege induziert werden. Im Vergleich zu anderen Applikationsformen (s.c., i.m., i.v.) traten selbst bei hoher Dosierung und langer Anwendungszeit nur geringe Antikörperreaktionen auf.

Große Bedeutung im Hinblick auf die Aerosolimpfung des Menschen besitzen die von Fontanges et al. durchgeführten Untersuchungen bei Affen. Sie setzten Affen dreimal im Abstand von 20 Tagen einem 25 Lf/ml enthaltenden Toxoid-Aerosol jeweils 45 Minuten aus. In dieser Zeit atmeten die Affen zwischen 36 bis 6 Lf je Tier ein. Der Erfolg der Immunisierung wurde mit Hilfe des Mäuseschutztests sowie der passiven Hämagglutination gemessen. Er wurde mit dem Ergebnis einer dreimaligen subkutanen Immunisierung mit insgesamt 250 Lf verglichen, nach welcher noch 18 Monate später Titer zwischen 0,5 und 1,0 U.A.I./ml feststellbar waren. Antitoxintiter über 0,2 U.A.I./ml nach eineinhalb Jahren wurden als Zeichen für sicheren Schutz bewertet. Bei subkutaner Applikation traten zwar höhere Titer

auf, allerdings nur nach höherer Antigendosierung wie bei der Aerosolimpfung. Die Titer nach aerogener Aufnahme lagen niedriger, zeigten aber selbst in der geringer dosierten Gruppe mit Titern von 0,05 bis 0,1 U.A.I./ml nach 18 Monaten bei fünf von sechs Tieren noch einen ausreichenden Schutz an, so daß von einer erfolgreichen Immunisierung gesprochen werden konnte. Selbst tragende Tiere blieben frei von Nebenwirkungen. Trotz der Einschränkung, daß Schwierigkeiten bestehen, die inhalierte Dosis zu bestimmen, schien per Aersol mit deutlich geringeren Antigenmengen als bei der Injektion ein Schutz erreichbar zu sein. Die optimale Anwendungsmöglichkeit für den Menschen sehen daher Fontanges et al. und auch Alexandrov et al. in der aerogenen Boosterungsimpfung nach subkutaner Erstvakzination.

Beim Menschen liegen bisher relativ wenige Ergebnisse über die Aerosolimpfung gegen Tetanus vor. Untersuchungen von Wigley et al. an 21 Personen im Alter von 23 bis 60 Jahren, die 1 bis 8 Jahre zuvor eine subkutane Toxoidinjektion erhalten hatten, bewiesen, daß eine Boosterimpfung gegen Tetanus bei Erwachsenen aber durchaus möglich ist. Das Toxoid wurde entweder im Abstand von 12 Tagen zweimal vernebelt oder über ein Mundstück eingeatmet. Zur Kontrolle erhielten sechs Personen das Toxoid subkutan. Nebenwirkungen traten in keiner Gruppe auf. Der Antikörperanstieg war, trotz einer 50 % höheren Dosis in der subkutan immunisierten Gruppe, mit der Aerosolgruppe vergleichbar. Es ließ sich ein meßbarer Anstieg der Sputum-Antikörper

nach der Boosterung nur in der Aerosolgruppe feststellen. Signifikante Veränderungen der Antikörperspiegel im Nasensekret traten dagegen bei keiner Gruppe auf. Der in jeder Gruppe meßbare Antitoxinanstieg im Blutserum sprach eindeutig für die Möglichkeit der Aerosolboosterung bei der Tetanus-schutzimpfung des Menschen.

Ähnlich gute Ergebnisse wie mit der monovalenten Tetanus-Aerosolimpfung beim Menschen wurden auch mit einer bivalenten Aerosolvakzine bestehend aus Tetanus-Toxoid und Typhus-Antigen erzielt (2,14,25,51).

Auch die direkte Instillation von Tetanus-Toxoid in die Nase führte zu einer Immunität. Ramon und Zoeller (33,56) träufelten Versuchspersonen 2-mal täglich über 6 Tage Tetanus-Toxoid in die Nase. Dem Toxoid wurde, nach Eindampfen zur Sirupkonsistenz, Glycerin zugesetzt. Der Glycerinzusatz gestattete ein leichteres Einträufeln in die Nasenhöhle und verhinderte infolge seines Haftungsvermögens auf der Nasenschleimhaut ein Herausfließen. Die Immunisierung erfolgte bei Personen, die schon mehrfach vorgeimpft waren. 8 Tage nach der nasalen Boosterimpfung konnte ein um das zehnfache erhöhter Neutralisationstiter gemessen werden. Dieses Ergebnis konnte durch Versuche am Kaninchen bestätigt werden. Neben den Instillationen von flüssigem Toxoid eignet sich auch das Einblasen von trockenem Toxoid in die Nase zur nasalen Impfung (56).

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Ramon beim Menschen wurden dann später von Gold, Alatyrtseva et al. und Said Bilal bestätigt. Die direkte nasale Impfung wird als hervorragendes Mittel zur Revakzinierung empfohlen, vor allem wegen des Fehlens von allergischen Reaktionen.

Baljer et al. (4,5) verglichen bei der Maus die Wirksamkeit der nasalen Impfung gegen Tetanus mit der einer oralen und subkutanen Impfung. Am besten schnitt dabei die subkutane Impfung ab. Eine einmalige Applikation von 2 Lf Tetanus-Toxoid schützte 100 % der Tiere vor einer Belastung mit 10 LD₅₀ Tetanus-Toxin. Bei der nasalen Applikation benötigten sie dagegen für eine Schutzquote von 80% eine einmalige Dosis von 100 Lf. Diesen beiden Impfformen war die orale Impfung unterlegen. Nach einmaliger oraler Impfung mit der hohen Dosis von 200 Lf Tetanus-Toxoid betrug der Schutzwert nur 75 Prozent. Auf Grund ihrer Ergebnisse schlagen sie vor die parenterale Impfung dann durch die nasale Impfung zu ersetzen, wenn bei Impfungen Überempfindlichkeits- oder Lokalreaktionen zu befürchten sind (5).

3. Material und Methoden

3.1. Versuchspersonen

Als Probanden stellten sich 76 Personen-durchwegs männliche oder weibliche Krankenpflegekräfte-freiwillig zur Verfügung. Vor Versuchsbeginn wurden von jedem Probanden Alter und Zahl der vorangegangenen Tetanus-Impfungen aufgenommen. Das Alter der Versuchspersonen lag zwischen 18 und 32 Jahren.

3.2. Impfstoff

Zur oralen und nasalen Immunisierung verwendeten wir ein mit Formalin inaktiviertes Tetanus-Toxin der Firma Behring-Werke AG, Marburg. Das Toxoid war hochgereinigt und enthielt keine Adjuvantien. Die Dichte des Toxoid-Konzentrats betrug 2000 Lf pro ml.

Zur intramuskulären Impfung wurde das handelsübliche Tetanol der Firma Behring-Werke AG, Marburg eingesetzt.

3.3. Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte oral, nasal und intramuskulär.

Die orale Impfung wurde wie folgt vorgenommen:

- a) das Toxoid wurde auf ein Stück Zucker geträufelt und den Versuchspersonen zum Lutschen gegeben;
- b) das Toxoid wurde in Wasser verdünnt und von den Versuchspersonen ca. 1/2 Minute gegurgelt;
- c) das Toxoid wurde sofort geschluckt.

Bei der nasalen Impfung tröpfelten wir das Toxoid mit einer Tropfpipette in die Nase.

Die parenterale Impfung wurde wie üblich intramuskulär vorgenommen.

3.4. Applikationsmodus und Impfdosis

Oral impften wir je nach Versuchsgruppe einmal oder dreimal an drei aufeinanderfolgenden Tagen, nasal und intramuskulär dagegen alle Versuchsgruppen nur einmal. Die Einzeldosis schwankte bei der oralen Impfung zwischen 500 und 2000 Lf, bei der nasalen betrug sie 1000 Lf und bei der intramuskulären Impfung 150 Lf.

3.5. Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde in der Regel vor und 14 Tage nach der Impfung durchgeführt. Bei einem Teil der Versuchspersonen entnahmen wir auch 4 und 6 Wochen nach der Impfung Blut.

3.6. Gewinnung der Sera

Das Blut wurde nach der Entnahme über Nacht im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt und am nächsten Tag bei 3000 UpM zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bis zur Durchführung der Antitoxinbestimmung bei -20°C eingefroren.

3.7. Indirekte Hämagglutination

3.7.1. Immunserum

Zwei Kaninchen wurden im Abstand von 3 Tagen insgesamt 6mal immunisiert. Die Toxoiddosis wurde von 2 Lf bei der ersten Impfung auf 2000 Lf bei der 6. Impfung gesteigert. 14 Tage nach der letzten Impfung wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. Das Serum bei -20° C eingefroren.

3.7.2. Behandlung der Seren

Die Seren wurden vor der Durchführung des Testes bei 56° C im Wasserbad 30 Minuten inaktiviert und anschließend mit Hammelerythrozyten absorbiert. Dazu wurden 0,1 ml Hammelerythrozyten zu je 1ml Serum pipettiert und nach etwa 1stündiger Bebrütung des Gemisches wieder abzentrifugiert.

3.7.3. Antigen

Als Antigen verwendeten wir das gleiche Tetanus-Toxoid-Konzentrat wie zur Impfung.

3.7.4. Sensibilisierung der Erythrozyten

Die Reaktion wurde mit Hammelblutkörperchen (HE) durchgeführt. Zur Sensibilisierung der Erythrozyten mischten wir eine 2,5%ige HE-Suspension mit gleichem Volumen Tetanus-Toxoid in einer Konzentration von 1000 Lf pro ml und bebrüteten das Gemisch 2 Stunden bei 37° C. Anschließend wurden die Erythrozyten zweimal

in 0,14 M NaCl gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5 % eingestellt.

3.7.5. Durchführung des Testes

Von den Humansenen wurde in Agglutinationsröhrchen eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen mit 0,3 ml Serum angelegt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,3 ml sensibilisierte HE pipettiert.

Als Kontrollen wurden ein Kaninchenimmunserum (positive Serumkontrolle) und ein humanes Normalserum (negative Serumkontrolle) parallel zu den übrigen Seren getestet. Ferner wurden alle Seren mit nichtsensibilisierten HE (Serumkontrolle) und die verwendete NaCl-Lösung mit sensibilisierten HE (NaCl-Kontrolle) auf unspezifische Reaktionen geprüft.

Nach 16stündiger Bebrütung der Gemische bei Zimmertemperatur erfolgte die Ablesung der Reaktion.

3.8. Antitoxinbestimmung nach der L₊-Methode

Die Seren der geimpften Personen untersuchten wir auf den Gehalt an neutralisierenden Antitoxinen. Die Bestimmung des Antitoxintiters in Internationalen Einheiten (I.E.) wurde nach der L₊-Methode durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Totwerte der mit dem zu prüfenden Antitoxin injizierten Tiere mit den Totwerten der mit dem

Standard-Antitoxin injizierten Kontrolltiere.

Als Standard verwendeten wir ein Tetanus-Antitoxinserum mit einem Titer von 10 I.E. pro ml, das uns von der Firma Behring-Werke AG, Marburg/Lahn zur Verfügung gestellt wurde. Pro Serumverdünnung wurde eine Maus angesetzt.

3.2. Ergebnisse

Die bisher vorliegenden Ergebnisse über die orale Immunisierung gegen Tetanus deuteten daraufhin, daß das Tetanus-Toxoid im Magen-Darm-Kanal abgebaut wird (s.Schrifttum). Bei der Maus wurden die immunisierenden Eigenschaften des Toxoids durch die Magenpassage praktisch sofort und im Dünndarm nach wenigen Stunden zerstört (Baljer et al.). Aufbauend auf diesen an Tierversuchen gewonnenen Erfahrungen, wählten wir, in unseren Versuchen beim Menschen, die Applikationsmethoden für die orale Impfung von vornherein so, daß eine optimale Persorption des Toxoids im Mund- und Rachenbereich möglich war. Die für die Versuche ausgewählten Personen teilten wir in 2 Gruppen ein, nämlich in serologisch positive und negative Personen, wobei wir bei den serologisch negativen Personen vom Vorbericht her nicht immer ausschließen konnten, ob sie nicht schon vor langer Zeit gegen Tetanus immunisiert worden waren und deshalb bereits wieder keine nachweisbaren Antitoxine im Serum hatten.

Im ersten Versuch träufelten wir flüssiges Toxoid auf ein Stück Würfelzucker und ließen die Impflinge dieses Stück Zucker lutschen. Die Impfdosis betrug 500 Lf, was in etwa der 3-fachen intramuskulären Dosis entspricht. Die Ergebnisse der vor und 2, 4 und 6 Wochen nach der Impfung durchgeführten serologischen Untersuchungen sind in Tabelle .1 zusammengefaßt.

In der vor der Impfung serologisch positiven Personengruppe lagen die mittleren Agglutinationstiter vor der Impfung bei 1:400 und die Neutralisationstiter bei 0,9 I.E.. Die Serumproben der zweiten Gruppe waren in beiden Testen negativ. Nach der oralen Impfung kam es, unabhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung, in beiden Gruppen zu keinem Antitoxintiteranstieg. Sowohl die Boosterimpfung als auch die Primärimpfung stimulierte keine in der indirekten Hämagglutination oder der L_+ -Methode meßbare Antitoxinbildung.

Wir versuchten nun durch die Verdopplung der Impfdosis und Änderung des Applikationsmodus zu einem positiven Ergebnis zu kommen. Einer serologisch bereits positiven und einer serologisch negativen Gruppe verabreichten wir 1000 Lf flüssiges Tetanus-Toxoid auf einem Teelöffel in einer Menge von 5ml und ließen dann die Probanden mit dem Toxoid morgens vor dem Frühstück ca. eine halbe Minute gurgeln. Damit wollten wir einen noch besseren Kontakt des Toxoids mit den Mund- und Rachenschleimhäuten erreichen.

Wie das Ergebnis der mittleren Antitoxintiter in Tabelle 2 zeigt, kam es tatsächlich nach dieser Art der oralen Impfung bei den bereits vorimmunisierten Personen zu einer schwachen Immunreaktion. Der mittlere Agglutinationstiter stieg 2 Wochen nach der Impfung von 1:903 auf 1:1000 an und der mit der L_+ -Methode bestimmte mittlere Neutralisationstiter von 2,2 I.E. vor der Impfung auf 2,9 I.E. 2 Wochen nach der oralen

Impfung. 6 Wochen post vaccinationem war kein weiteres Ansteigen der Titer festzustellen. Das Titerniveau entsprach genau dem nach 2 Wochen. Bei Personen die vor der Impfung serologisch negativ waren, blieb dagegen eine Immunreaktion aus. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes waren im Serum keine Antitoxine nachzuweisen.

In den Modellversuchen an der Maus hatte sich gezeigt, daß sich das Immunitätsergebnis nach oraler Impfung verbessern läßt, wenn man die orale Impfdosis auf mehrere Impfungen verteilt. Es interessierte nun die Frage, ob sich dieses Ergebnis auch beim Menschen bestätigt. Wir verteilten dazu die im letzten Versuch verwendete Impfdosis von 1000 Lf auf 3 aufeinanderfolgende Tage und verimpften pro Tag 333 Lf Tetanus-Toxoid. Der Applikationsmodus entsprach dem im 2. Versuch. Einen Überblick über die Antitoxintiter vor und nach der dreimaligen Impfung vermittelt Tabelle 3.

Die mehrmalige Impfung mit 333 Lf Toxoid brachte nicht den gewünschten Erfolg. Die mittleren Antitoxintiter von 1:510 bzw. 1,2 I.E. bei der Boosterimpfung änderten sich während der 6 wöchigen Beobachtungszeit nicht. Auch bei der Primär-impfung konnten nach der dreimaligen oralen Impfung keine meßbaren Antitoxintiter festgestellt werden. Das Ergebnis war damit sogar schlechter als das nach einmaliger oraler Impfung mit der Gesamtdosis. Möglicherweise darf bei der Einzelimpfung eine gewisse Grenzdosis für das in Gang bringen einer Immunreaktion nicht unterschritten werden. Vermutlich gibt nur eine relativ hohe Einzeldosis die Gewähr, daß über-

haupt Toxoid an den Schleimhäuten haftet und dann persorbiert werden kann.

Um dies abzuklären verimpften wir in einem weiteren Versuch an 3 aufeinanderfolgenden Tagen die extrem hohe Einzeldosis von 2000 Lf Tetanus-Toxoid, das ergab insgesamt pro Person eine Dosis von 6000 Lf. Als Applikationsmethode wählten wir wieder, um den direkten Vergleich zu erhalten, das "Gurgeln" des Toxoids. Wie Tabelle 4 zeigt brachte die orale Impfung auch in diesem Versuch kein brauchbares Ergebnis. Die mittleren Antitoxintiter vor der Impfung von 1:2600 bzw. 6,2 I.E, die zufälligerweise sehr viel höher lagen als die bisherigen Ausgangstiter, stiegen bis zum Zeitpunkt 2 Wochen post vaccinationem nur schwach an und zwar auf 1:2940 bzw. 6,6 I.E.. Die Zeitpunkte 4 und 6 Wochen nach der Impfung untersuchten wir nicht, da die bisherigen Ergebnisse kein Unterschied zum Zeitpunkt 2 Wochen gebracht hatten. Die Seren der Erstimpflinge blieben auch nach der Impfung bei beiden Nachweismethoden negativ.

Weitere Dosissteigerungen bei der oralen Impfung erschienen uns nicht mehr sinnvoll, da damit ein Praxiseinsatz der oralen Impfung allein aus herstellungstechnischen und wirtschaftlichen Gründen scheitern würde. Wenn wir das Ergebnis beim Menschen mit dem bei der Maus vergleichen, so darf man nicht übersehen, daß bei der Maus erst eine orale Impfung mit der 100- bis 300-fachen parenteralen Dosis auch eine der

parenteralen Impfung annähernd vergleichbare Immunantwort ergab. In unseren Versuchen beim Menschen erreichten wir mit der höchsten Dosis von 6000 Lf erst die 30- bis 40-fache Dosis der üblichen intramuskulären Impfung, das heißt um die Antitoxinbildung ausreichend zu stimulieren müßten wir wahrscheinlich beim Menschen die Dosis nochmals um das 10-fache auf 60 000 Lf steigern. Damit würden wir aber in einem Dosisbereich liegen der utopisch ist. Aus dieser Überlegung heraus führten wir keine weiteren Versuche mit der oralen Impfung durch. Vielmehr prüften wir noch die nach den bisherigen Tierversuchen (s. Schrifttum) sehr viel besser einzuschätzende nasale Impfung.

Als intranasale Applikationsmethode wählten wir für unsere Versuche das direkte Einträufeln des Tetanus-Toxoids in die Nase. Wir tropften jeweils 1 Tropfen Tetanus-Toxoid in die beiden Nasenlöcher und ließen die Versuchspersonen das Toxoid hochschnupfen. Die nasale Dosis betrug 1000 Lf, das entspricht in etwa einer sechsfachen intramuskulären Dosis "Tetanol". Einen Überblick über die Ergebnisse der intranasalen Impfung gegen Tetanus vermittelt Tabelle 5.

Bei der intranasalen Impfung kam es erstmals zu signifikanten Antitoxintiteranstiegen nach der Impfung. Bereits parenteral vorgeimpfte Personen verzeichneten in der indirekten Hämagglutination einen Titeranstieg von 1:100 auf 1:4000 2 Wochen nach der Impfung. Die vor der Impfung serologisch negativen Probanden

hatten 2 Wochen nach der Nasalimpfung einen mittleren Agglutinationstiter von 1:320. Entsprechend fiel das Ergebnis mit der L_+ -Methode aus. Die Boosterimpfung brachte einen Anstieg von 0,2 I.E. vor der Impfung auf 10 I.E. 2 Wochen nach der Impfung und die Primärimpfung einen Anstieg von negativ auf 1 I.E..

Um die Qualität des Ergebnisses mit der nasalen Impfung echt beurteilen zu können führten wir unter unseren Versuchsbedingungen vergleichend die allgemein übliche intramuskuläre Impfung mit Tetanol durch. Wie die in Tabelle 6 zusammengestellten mittleren Antitoxintiter zeigen, erreichte die intranasale Boosterimpfung ein der intramuskulären Impfung durchaus gleichwertiges Ergebnis. Die Agglutinationstiter stiegen bei den intramuskulär geimpften Personen von 1:300 auf 1:4000 2 Wochen nach der Impfung. Bei der nasalen Impfung lag das Verhältnis Antitoxintiter vor und nach der Impfung bei 1:100 zu 1:4000. In der serologisch negativen Impfgruppe kam es durch die intramuskuläre Impfung dagegen zu einem wesentlich besseren Immunisierungsergebnis. Der Antitoxintiter betrug 2 Wochen nach der Erstimpfung im Durchschnitt 1:5120, während wir in der nasalen Gruppe nur Titer um 1:320 maßen. Die Neutralisationstiter stimmten mit den Agglutinationstiter überein. Für die Boosterimpfung stellten wir einen Anstieg von 0,9 I.E. auf 9,8 I.E. fest und bei der Erstimpfung einen Anstieg von negativ auf 11,6 I.E. pro ml. Etwas überraschend ist, daß die Erstimpfung einen höheren

Titer stimulierte als die Boosterimpfung. Möglicherweise verbargen sich unter den Erstimpflingen Probanden, die serologisch zwar negativ reagierten, eventuell aber doch vor längerer Zeit gegen Tetanus immunisiert worden waren.

Einen zusammenfassenden Überblick über unsere Ergebnisse mit der oralen, nasalen und intramuskulären Tetanus-Schutzimpfung bei bereits vorgeimpften Personen gibt Abbildung 1. Wir haben hier die Ergebnisse der indirekten Hämagglutinationen der L_+ -Methode gegenübergestellt. Da wir in den ersten Versuchen schon gesehen hatten, daß sich schon 2 Wochen post vaccinationem die maximalen Antitoxintiter ausgebildet hatten, verzichteten wir in dieser Zusammenstellung auf die serologischen Ergebnisse 4 und 6 Wochen nach der Impfung. Die Abbildung veranschaulicht nochmals, daß für die orale Impfung trotz der höchsten Impfdosis keine oder nur sehr geringe Antitoxintiteranstiege gemessen wurden. Signifikante Anstiege waren nur bei der nasalen und intramuskulären Impfung festzustellen, die in diesen beiden Versuchsgruppen in etwa der gleichen Größenordnung lagen. Man darf aber nicht vergessen, daß intranasal etwas über fünfmal soviel Toxoid verimpft wurde als intramuskulär.

Die Abbildung zeigt darüberhinaus, daß eine gute Korrelation zwischen dem Hämagglutinationstiter und dem Neutralisationstiter besteht. Die Titerbewegungen lagen bei beiden Methoden jeweils in der gleichen Größenordnung. Bei unserem Versuchs-

ansatz entsprach ein Hämagglutinationstiter von 1:400 in etwa einem Neutralisationstiter von 1 I.E..

TABELLE 1

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen die einmal oral über ein Stück Zucker mit Tetanus-Toxoid (500 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis mit der indirekten Hämagglutination (geometrische Mittelwerte):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intramuskulär vor-immunisiert	10	1:400	1:400	1:400	1:400
noch nicht immunisiert	4	neg.	neg.	neg.	neg.

B. Ergebnis mit der L₊-Methode (geometrische Mittelwerte):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intramuskulär vor-immunisiert	10	0,9 I.E.	0,9 I.E.	0,9 I.E.	0,9 I.E.
noch nicht immunisiert	4	neg.	neg.	neg.	neg.

TABELLE 2

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen, die einmal oral (gurgeln) mit Tetanus-Toxoid (1000 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis in der indirekten Hämagglutination (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	1:903	1:1000	n.d. ¹⁾	1:980
noch nicht immunisiert	5	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	neg.

B. Ergebnis in der L₊-Methode (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	2,2 I.E.	2,9 I.E.	n.d. ¹⁾	2,9 I.E.
noch nicht immunisiert	5	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	neg.

¹⁾nicht durchgeführt

TABELLE 3

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen, die dreimal oral (gurgeln) mit Tetanus-Toxoid (3x333 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis in der indirekten Hämagglutination (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	1:510	1:510	n.d. ¹⁾	1:510
noch nicht immunisiert	3	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	neg.

B. Ergebnis in der L₊-Methode (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	1,2 I.E.	1,2 I.E.	n.d. ¹⁾	1,2 I.E.
noch nicht immunisiert	3	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	neg.

¹⁾ nicht durchgeführt

TABELLE 4

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen, die dreimal oral (gurgeln) mit Tetanus-Toxoid (3x2000 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis in der indirekten Hämagglutination (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	1:2600	1:2940	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	5	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

B. Ergebnis in der L₊-Methode (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	6,2 I.E.	6,6 I.E.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	5	neg.	neg.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

¹⁾nicht durchgeführt

TABELLE 5

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen die einmal intranasal mit Tetanus-Toxoid (1000 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis in der indirekten Hämagglutination (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	1:100	1:4000	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	5	neg.	1:320	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

B. Ergebnis in der L₊-Methode (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intra-muskulär vor-immunisiert	10	0,2 I.E.	10 I.E.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	6	neg.	1 I.E.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

¹⁾nicht durchgeführt

TABELLE 6

Mittlerer Antitoxintiter bei Versuchspersonen die einmal intramuskulär mit Tetanus-Toxoid (150 Lf) immunisiert wurden.

A. Ergebnis in der indirekten Hämagglutination (geometrisches Mittel):

Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intramuskulär vorimmunisiert	10	1:300	1:4000	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	5	neg.	1:5120	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

B. Ergebnis in der L₊-Methode (geometrisches Mittel):

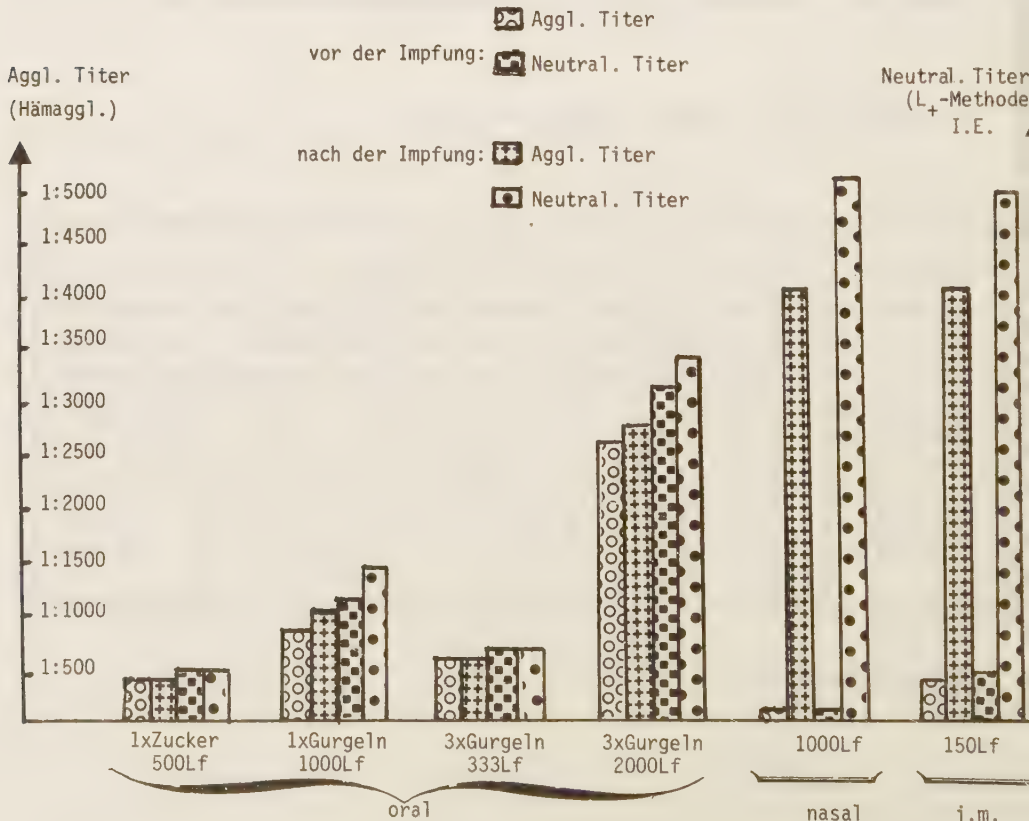
Status der Versuchspersonen	n	Antitoxintiter			
		vor der Impfung	2 Wochen nach der Impfung	4 Wochen nach der Impfung	6 Wochen nach der Impfung
bereits intramuskulär vorimmunisiert	10	0,9 I.E.	9,8 I.E.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾
noch nicht immunisiert	5	neg.	11,6 I.E.	n.d. ¹⁾	n.d. ¹⁾

¹⁾ nicht durchgeführt

Abb. 1: Überblick über das Immunisierungsergebnis bei Versuchspersonen nach oraler, intranasaler und intramuskulärer Boosterimpfung gegen Tetanus.

Applikations- art		Zahl der Imp- fungen	Impf- ¹⁾ dosis in Lf	Mittlerer Antitoxintiter			
				L ₊ -Methode		Indirekte Hämagglutination	
				vor der Impfung	2 Wochen nach d. Impf.	vor der Impfung	2 Wochen nach d. Impf.
o r a l	über Zucker	1	500	0,9 I.E.	0,9 I.E.	1:400	1:400
	Gurgeln	1	1000	2,2 I.E.	2,9 I.E.	1:903	1:1000
		3	333	1,2 I.E.	1,2 I.E.	1:510	1:510
		3	2000	6,2 I.E.	6,6 I.E.	1:2600	1:2940
intranasal		1	1000	0,2 I.E.	10 I.E.	1:100	1:4000
intramuskulär		1	150	0,9 I.E.	9,8 I.E.	1:300	1:4000

1) pro Einzelimpfung



5. Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stimmten im wesentlichen mit den aus der Literatur vorliegenden Resultaten überein: das Tetanus-Toxoid wird bei der Magenpassage weitgehend zerstört. Für eine orale Immunisierung stehen somit praktisch nur 2 Applikationsmöglichkeiten zur Wahl. Man kann versuchen, das Tetanus-Toxoid entweder über die Schleimhäute des Mund- und Rachenbereiches oder über die Dünndarmschleimhaut zu verabreichen. Wir entschieden uns für die erste Möglichkeit. Den optimalen Kontakt mit den Schleimhäuten glaubten wir durch das Gurgeln des Toxoids oder durch das Lutschen des Toxoids mit Zucker erreicht zu haben. Die Immunantwort war aber selbst bei extrem hoher Dosierung nach der Boosterimpfung nur sehr schwach, während die Primärimpfung in allen Versuchen negativ blieb.

Die andere Möglichkeit, nämlich die Impfung über die Dünndarmschleimhaut, ist in der Praxis nur durch die Verabreichung des Toxoids in Dragees, die das Toxoid vor dem Abbau im Magen schützen, möglich. Aber auch mit dieser Methode erreichten Greenberg und Fleming nur eine unbefriedigende Immunantwort. In vergleichenden Versuchen bei der Maus war die "Dünndarmimpfung" sogar wesentlich schlechter, als die Impfung über die Schleimhäute des oberen Digestions- und Respirations-trakt (4,5).

Auf Grund dieser Untersuchungen kann man der oralen Impfung mit Tetanus-Toxoid nur geringe Chancen für einen Einsatz in der Praxis einräumen. Die Immunreaktion ist zu schwach und es ist fraglich, ob eine weitere Dosissteigerung imstande ist, eine stärkere Immunität zu stimulieren. Auf jeden Fall können wir sagen, daß diese Impfdosis dann in einem Bereich liegen muß, die für die Impfpraxis nicht mehr darstellbar ist.

Diesen Ergebnissen widersprechen nur die Untersuchungen von Veronesi et al.. Obwohl diese Arbeitsgruppe oral über normale, nicht vor dem Abbau im Magen geschützte Tabletten nur ca. ein fünftel unserer Dosis verabreichten, maßen sie bei den Impflingen Antitoxintiteranstiege um das fünfzehnfache. Ursachen für diese Diskrepanz sind auf Grund ihrer Angaben in Material und Methoden nicht erkennbar.

Nachdem die orale Immunisierung in unseren Untersuchungen selbst bei extrem hoher Dosierung nur unbefriedigende Ergebnisse brachte, prüften wir die in anderen Versuchen weitaus günstiger beurteilte nasale Impfung. Wir wählten, um möglichst praxisnah zu bleiben, als einfachste nasale Applikationsform das direkte Eintropfen des Toxoids in die Nase. Bei dieser Impfarm wurde ein Teil des Toxoids über die Schleimhäute des Nasen- und Rachenraumes persorbiert und der andere nicht persorbierte Anteil abgeschluckt und im Magen zerstört. In die Bronchien und Lunge gelangt normalerweise kein Toxoid. Das Immunisierungsergebnis

erfüllte die vom "Maus-Modell" her erhofften Erwartungen. Sowohl als Boosterimpfung als auch als Primärimpfung stimulierte die nasale Impfung eine deutliche Immunität. Bei der Boosterimpfung entsprach das Ergebnis sogar dem der intramuskulären Impfung, das heißt man kann die intramuskuläre Boosterimpfung vollwertig durch eine einmalige nasale Impfung ersetzen. Die Antitoxintiter nach Impfung bei Erstimpfungen lagen zwar um das zehnfache unter den Werten der intramuskulären Impfung, erreichten aber mit einem mittleren Antitoxintiter von 1:320 bzw. 1 I.E. immer noch einen Wert der weit über dem geforderten Mindestschutzwert von 0,01 bis 0,003 I.E. (33,46) lag.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Befunde aus früheren Untersuchungen mit der nasalen Impfung gegen Tetanus (s. Schrifttum). Nach Alatyrtsseva et al. läßt sich mit dieser Applikationsmethode auch eine Kombinationsimpfung gegen Diphtherie und Tetanus durchführen. Einstimmig wurde diese Impfmethode bisher vor allem als Revakzinationsmethode empfohlen. Auf Grund unserer Untersuchungen kann man aber durchaus daran denken, die nasale Impfung auch als Primärimpfung einzusetzen.

Auf die auch als sehr gut beschriebene Aerosolimpfung haben wir bewußt verzichtet, denn wir glauben, daß die direkte nasale Impfung in jedem Fall der Aerosolimpfung vorzuziehen ist. Die Aerosolimpfung ist im Gegensatz zur nasalen Impfung mit Allergien belastet (13,14,15), so daß man auch bei der Impfung mit Tetanus-Toxoid zumindest mit Zwischenfällen rechnen

muß. Darüberhinaus erfordert die Aerosolimpfung einen großen technischen Aufwand. Die Tatsache, daß man zur Impfung für kurze Zeit in einen geschlossenen Raum treten muß, vermindert auch sicher die allgemeine Impfbereitschaft. Die Aerosolimpfung entzieht damit der nasalen Impfung die wesentlichen Vorteile gegenüber der parenteralen Impfung. Die direkte nasale Impfung kann man dagegen in der von uns praktizierten Form als wirtschaftliche, unschädliche und schmerzlose Impfform für die Vakzination gegen Tetanus empfehlen.

6. Zusammenfassung

In Immunisierungsversuchen beim Menschen wurden vergleichend die orale, nasale und intramuskuläre Impfung mit Tetanus-Toxoid unter Praxisbedingungen untersucht. Die Wirksamkeit der Impfungen wurde durch die Bestimmung der Serumantitoxine mit der indirekten Hämagglutination und der L_+ -Methode geprüft.

Die orale Boosterimpfung brachte trotz der höchsten Impfdosis nur sehr geringe und unregelmäßige Antitoxintiteranstiege. Im günstigsten Fall wurde bei der dreimaligen oralen Impfung mit 2000 Lf Toxoid ein Anstieg von 6,2 I.E. auf 6,6 I.E. gemessen. Die orale Primärimpfung verlief negativ.

Nach nasaler Boosterimpfung mit 1000 Lf stellten wir einen Antitoxintiteranstieg um das zehnfache fest. Mit der nasalen Primärimpfung erreichten wir einen mittleren Neutralisationstiter von 1 I.E..

Das Ergebnis der intramuskulären Boosterimpfung (150 Lf) entsprach dem nach nasaler Boosterimpfung. Bei der Primärimpfung lagen die Antitoxintiter dagegen deutlich über denen der nasalen Impfung. Der mittlere Antitoxintiter betrug 11,6 I.E..

Für die Praxis kann die nasale Impfung gegen Tetanus sowohl als Erst- wie Boosterimpfung empfohlen werden.

Summary

Under field conditions the comparative effectiveness of oral, nasal and intramuscular vaccination of humans with tetanus toxoid was investigated. The effectiveness was tested by the determination of antitoxin titers with indirect hemagglutination and L_+ -Methods.

Oral booster vaccination produced only very low and irregular increases in antitoxin titer even at the highest dose of 6000 Lf toxoid. In the most favourable case with the triple oral immunization a rise from 6,2 to 6,6 I.E. was achieved. Primary oral vaccination failed to stimulate measurable antitoxin production.

After nasal booster vaccination with 1000 Lf of toxoid a ten-fold rise in antitoxin titer was detectable. Following primary nasal vaccination an average neutralisation titer of 1 I.E. was achieved.

The results of intramuscular and nasal booster vaccinations were similar although the antitoxin titers were significantly higher after primary intramuscular vaccination than after primary nasal vaccination. The average antitoxin titer amounted 11,6 I.E..

These results indicate that primary and booster vaccination against tetanus by the nasal route is a safe and effective procedure.

8. Literaturverzeichnis

1. Alatyrtseva, I.E. u. A.N. Mayansky: Single intranasal revaccination with diphtheria-tetanus toxoid.
J. Microbiol. (Moskau) 5, 81
(1967)
2. Alexandrov, N.J., N.E. Gefen, N.B. Egorova, I.V. Vorantsov,
L.S. Kreinin, J. Mirishnischenko: A comparative study of
reactogenicity and immunological
efficiency in aerosol and subcutaneous
methods of typhoid and tetanus revacci-
nation.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol Immunbiol, 38,
15 (1967)
3. Alexandrov, N.J., N.E. Gefen, N.B. Egorova, V.N. Efremova,
J.V. Vorantsov, u. J.N. Miroshnischenko: Aerosol revacci-
nation with typhoidbotulin A and B
trivaccine and typhoid-tetanus-botulin
A and B tetravaccine using experimental
animals.
J. Microbiol. Epidemiol. Immunbiol. 41,
80 (1970)
4. Baljer, G., H. Starflinger, K.H. Sorg, J. Sailer und A. Mayr:
Experimentelle Untersuchungen zur oralen
Immunisierung mit Tetanus-Toxoid.
Zbl.Bakt.Hyg. I Abt.Orig. A 232,
488-498 (1975)
5. Baljer, G., J. Sailer und A. Mayr: Vergleichende Untersuchungen
über eine lokale Immunisierung gegen
Clostridium tetani und Clostridium novyi.
Wehrmedizinische Mschr. (1978) im Druck

6. Bartlema, H.C., R. Braunius und L. Hölscher: Studies on respiratory immunization with tetanus toxoid: the role of adjuvants.
J. Hyg. (Camb.) 70, 627 (1972)
7. Bartlema, H.C.: Aerosol vaccination with tetanus toxoid.
Bact. Rev. 30, 633 (1966)
8. Bartlema, H.C., R. Braunius: Partial unresponsiveness of mice to subcutaneous tetanus vaccination following aerosol treatment with plain toxoid.
Nature, 222, 1289 (1969)
9. Carrière, G.: Etude expérimentale sur le sort des toxines et des antitoxines introduites dans le tube digestif des animaux
Ann. Inst. Pasteur 13, 435 (1899)
10. Charrin, M. und G. Levèvre: Action des sucs digestifs sur les toxines.
C.R. Soc. Biol. 50, 870 (1898)
11. Dietrich, W.: Resorption von Tetanus-Gift durch den Darm.
Klin. Wschr. 1, 1160, 1922
12. Dumas, J., D. Combiesco und J. Balteano: Action de toxines tétanique et diphtérique per os.
C.R. Ac. Sci. 175, 793 (1922)
13. Egorova, N.B., V.N. Efremova u. S.F. Fedyaev: Immunbiologische Vergleiche beim Studium von Trocken- und Flüssigvakzine-Aerosolen im Tierversuch. I. Die immunologischen und anaphylaktogenen Eigenschaften des Trocken- und Flüssigvakzinaerosols aus Tetanustoxoid.
J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol. 40, 46, 60 (1969)

14. Egorova, N.B.: Reaktionen anaphylactiques et titres antitoxique dans les immunisations par aerosols et par voie souscutanée contre la typhoïde et le tétanos.
Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 39, 63, 68 (1968)
15. Egorova, N.B., V.N. Efremova, S.F. Fedyaev: Immunological parallels in studying dry and fluid vaccine aerosol in experiments on animal.
II Sensitizing action of tetanus Toxoid aerosol depending on fractional dispersive composition.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 42, 82 (1971)
16. Egorova, N.B., Miroschnichenko I.V., Vorontsova I.V., Bikulov I.M.: The efficiency of aerosol revaccination of man against tetanus depending on the schemes and methods of primary vaccinations.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 42, 90 (1971)
17. Finger, H., E. Habermann, K. Bracharz und H. Hof: Tetanus-Immunität im Serum.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 161, 118-193 (1975)
18. Fontanges, R., J.M. Fournier, H. Monteil, P. Darmenton und A. Gairard: L'immunisation par aerosols.
VII Vaccination des singes babouins par l'anatoxine tétanique lyophilisée et par le mélange a tétanique a diphtérique
Ann. Inst. Pasteur (Paris) 120, 831 (1970)

19. Fournier J.M.: L'immunisation par aerosols d'anatoxines
tétanique et diphtérique lyophilisées
(application à la vaccination de singe
cynocephale).
Thèse de Docorat en Médecine, Lyon
(1969)
20. Furbetta, F., M. Adorni Bracesi, G. Piazza: Reserche
sperimentali di vaccino profilassi
antitetanica per inalazione delle
anatossina.
Ist. Sieroter. Milan 20, 186-199
(1941)
21. Gerbrandy J.L.F., van Dura E.A.: Anamnestic secretory
antibody response in respiratory
secretory of intranasally immunized
mice.
J. Immunol. 109, 1146 (1972)
22. Gold, H.: Active immunization against tetanus by the
combined subcutaneous and intranasal
routes.
Am J. Surg. 48, 359 (1940)
23. Greenberg, L., Fleming, D.S.: Experience with oral immunisation
against diphtheria and tetanus in human
subjects.
Canad. Journ. Publ. Health 41, 445 (1950)
24. Habermann, E.R. und H.-H. Wellhöner: Schutz gegen Tetanus
völlig unzureichend - immer noch hohe
Letalität.
Ärztl. Prax. A. XXVI, 33 (1974)

25. Kreining, L.S., A.F. Smertina, G.E. Saburov: Effect
allergique sur les organes respiratoires
de la vaccination et de la révaccination
contre le tétanos et la typhoïde.
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol.
39, 130 (1968)
26. Lemétayer, E.: Essais d'immunisation active du lapin
et du cobaye par administration d'ana-
toxine tétanique par les voies uccale
et rectale
Presse med. 1935, 761
27. Leclerq, P.: Etude chez la souris du pouvoir adjuvant d'une
endotoxine bacterienne du cours de
la vaccination par aérosols d'anatoxine
tétanique lyophilisée.
Travail de la division de Microbiologie
du centre de recherches du service de
santé des armées, Lyon (1971).
28. Manson, M.H.: Can immunity to tetanus be procuced by the
oral route?
Proc. soc. exper. Biol. a. Med.
29, 561 (1932)
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 96, 463 (1930)
29. Nathan-Larrier, L, G. Ramon und E. Grasset: L'anatoxine
tétanique et l'immunité antitétanique
chez la mère et le nouveau né.
Ann. Inst. Pasteur 41, 848 (1927)
30. Nencki, M: Die Entgiftung der Toxinè durch die Verdauungs-
säfte.
Zbl.Bakt. I. Orig. 23, 840-880 (1898)

31. Ramon, G., Grasset, E.: Sur L'immunité antitoxique active
par voie buccale chez l'animal
d'expériences
C.R. Soc.Biol. 95, 1405 (1926) ref.
Zbl. ges. Hyg. 14, 906 (1927)
32. Ramon, G., Grasset, E.: Reserches sur le passage des toxines,
des anatoxines et des antitoxines à
travers les parois du tube digestif.
De l'immunité antitoxique active et
passive par voie digestif chez l'animal
d'expériences.
Ann. Inst. Pasteur 41, 868 (1927) ref.
Zbl. Bakt., I. Abtl. Ref. 88, 370 (1928)
33. Ramon, G., Zoeller, C.: Essais d'Immunisation antitoxique,
active et passive, par voie buccale
chez l'homme.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 95, 1409 (1926)
ref. Zbl. Ges. Hyg. 14, 907 (1927)
34. Ramon, G., CH. Zoeller: De l'immunisation antitoxique par
voie nasale chez l'homme et du mecanisme
de l'immunisation occulte.
C.R.Soc. Biol. 96, 11, 757-759 (1927)
35. Ramon, G. et CH. Zoeller: Nouveaux resultats concernant les
rhino-vaccinations antitoxiques.
Presse med. 949 (1927)
36. Ransora, F.: Das Schicksal des Tetanusgiftes nach seiner
intestinalen Einverleibung in den
Meerschweinchenorganismus.
D. Med. Wschr. 117 (1898)
37. Regamey, R.: Etude in vivo et in vitro sur le sort de la
toxine tétanique dans le tube digestif.
Ann. Inst. Pasteur 56, 87 (1936)

38. Said Bilal: Quelques notes sur l'emploi des anatoxines en Turquie.
Rev. Immun. 12, 261 (1948)
zit. nach Herrlich, A., Handbuch der Schutzimpfungen, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York (1965) S.446
39. Schützler, H. und W. Dockhorn: Untersuchungen zur aerogenen Hyperimmunisierung und aerogenen Hyperimmunserumbehandlung von Tieren. 1. Mitt.: Versuche an Pferden zur aerogenen Hyperimmunisierung mit Tetanusantigen u. zur aerogenen Behandlung mit Tetanus-Hyperimmunserum. Arch.exp.Vet.Med. 26, 12-24 (1972)
40. Schützler, H. und W. Dockhorn: Untersuchungen zur aerogenen Hyperimmunisierung und aerogenen Hyperimmunserumbehandlung von Tieren. 2. Mitt.: Versuche an Schafen zur aerogenen Hyperimmunisierung mit Tetanusantigenen.
Arch.exp.Vet.Med. 26, 789-896 (1972)
(1972)
41. Shulman-Satin, B.B. und T.J. Suchkova: Comparative immunomorphology of aerosol and subcutaneous immunization with typhoid antigen in a complex with tetanus toxoid. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol. 40, 18-22 (1969)
42. Silberschmidt, W.: Essais d'immunisation par inhalation I. Diphtérie et tétanos.
Ann. Inst. Pasteur 52, 690 (1934)

43. Stafford, E.S., T.B. Turner und L. Goldmann: On the
permanence of antitetanus immunization.
Am. Surg. 140, 563 (1954)

44. Titarenko, J.F.: Experimentelle Beobachtungen bei
Gruppenimpfungen mit Toxoid-Aerosolen
(Tetanus und Staphylokokken).
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.
33, 8-14 (1962)

45. Veronesi, R., A. Correa und J. Tavares: A new outlook on
the prophylaxis of tetanus: immunization
by the digestive route.
Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo
27, 123 (1972)

46. Vincent, H.: Action de la bile sur la toxine tétanique.
C.R. Soc. Biol. 63, 623 (1907)

47. Vincent, H.: Deuxième note sur les propriétés antitoxiques
de la bile. Action des éléments
composants de la bile sur la toxine
tétanique.
C.R. soc. Biol. 63, 695, (1907)

48. Vincent, H.: Action du gros intestin sur la toxine tétanique.
C.R. Soc. Biol. 64, 162 (1908)

49. Vincent, H.: Sur le mode de destruction de la toxine
tétanique dans l'estomac.
C.R. Soc. Biol. 64, 729 (1908)

50. Vincent, H.: Mode de destruction de la toxine tétanique
dans l'intestin; action antitoxique
du suc pancréatique active.
C.R. Soc. Biol. 64, 797 (1908)

51. Vorontsov, I.N., Egorova, N.B., Kreinin, L.S., Mirochnichenko I.V., Severtsova M.K., Svelov P.S., Smirnov B.I.
Rojnyatovskij M.K., Vaksman I.A., Bikulov I.M.:
Etude du caractère reactogene et de
l'efficacité de l'immunisation par
aerosols contre la typhoïde et le
tétanos
Voenno-Med. Zh. 4, 55-59 (1967)
52. Wigley, F.M., S.H. Wood und R.H. Waldman: Aerosol
immunization of humans with tetanus
toxoid.
J. Immunol. 103, 1096-1098 (1969)
53. Wishart, F.O. und L.K. Jackson: Recall dose of tetanus
toxoid by the intranasal or intraocular
route.
Canad. J. Pbl. Hlth. 41, 43 (1950)
54. Yamashiroya, H.M.; R. Ehrlich, J.M. Magis: Aerosol
vaccination with tetanus toxoid.
Bact. Rev. 30, 624 (1966)
55. Yamashiroya, H.M.; R. Ehrlich und J.M. Magis: Aerosol
immunization of guinea pigs with fluid
tetanus toxoid.
J. Bact. 91, 903 (1966)
56. Zoeller, C. und Ramon, G.: Les vaccinations par voie nasale.
Presse med. 1049 (1927)

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Anton Mayr möchte
ich an dieser Stelle für die Überlassung des
Themas und für wertvolle Hinweise danken.

Herrn Chefarzt Dr. Holzer danke ich für die
Durchsicht der Arbeit.

Lebenslauf

Am 10. Juni 1947 wurde ich, Ernst Baljer als Sohn des Georg Baljer und seiner Ehefrau Erika, geb. Waldner, in Teisendorf/Obb. geboren.

Nach 4 Klassen Volksschule in Weingarten trat ich 1958 in das Neue Gymnasium Ravensburg ein und legte dort 1967 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich mein Studium an der Universität München. Dort bestand ich auch das Staatsexamen am 19. Dezember 1973.

Als Medizinalassistent arbeitete ich in München und im Kreiskrankenhaus Bad Waldsee. Die Bestallung als Arzt erhielt ich im Mai 1975.

Seit September 1975 bin ich als Assistenzarzt im Psychiatrischen Landeskrankenhaus Weissenau, Akademisches Krankenhaus der Universität Ulm bzw. in der Abt. Neurologie der Universität Ulm tätig.

